

W5016-02

# **METHOD FOR RAPIDLY SOLID-PHASE MEASURING HIGH CONCENTRATION MAGNETIC BEADS**

**Publication number:** JP2003232793 (A)

**Publication date:** 2003-08-22

**Inventor(s):** ISHIKAWA EIJI; ODAWARA TAKUYA; MATSUI ATSUSHI +

**Applicant(s):** INT REAGENTS CORP +

**Classification:**

- international: **G01N33/553; G01N33/566; G01N33/58; G01N33/551; G01N33/566; G01N33/58;**  
(IPC1-7): G01N33/553; G01N33/566; G01N33/58

- European:

**Application number:** JP20020035065 20020213

**Priority number(s):** JP20020035065 20020213

**Abstract of JP 2003232793 (A)**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To accelerate a method for measuring a substance to be examined by its specific bonding substance by using the magnetic beads as a solid phase. ; **SOLUTION:** The method for measuring the substance to be examined accelerates an integration of the magnetic beads by a magnet by using the high concentration magnetic beads. Further, the method completely accelerates in combination in addition to the previous method by using a measuring labeled substance which can be measured in a short time. In this method, the magnetic beads of the concentration capable of integrating the magnetic beads integrated to 60% or more when the magnetic beads dispersed in a solution of 100 [mu]L in a test tube having an inner diameter of about 7 mm and an outer diameter of about 8 mm are integrated by the magnet for 5 s, are used partly or all of the steps. ; **COPYRIGHT:** (C) 2003,JPO

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-232793

(P2003-232793A)

(43) 公開日 平成15年8月22日 (2003.8.22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード* (参考)
G 0 1 N 33/553		G 0 1 N 33/553	2 G 0 4 5
33/566		33/566	
33/58		33/58	Z

審査請求 未請求 請求項の数15 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2002-35065(P2002-35065)	(71) 出願人	000170565 国際試薬株式会社 兵庫県神戸市西区高塚台4丁目3番2号
(22) 出願日	平成14年2月13日 (2002.2.13)	(72) 発明者	石川 榮治 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際 試薬株式会社研究開発センター内
		(72) 発明者	小田原 卓哉 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際 試薬株式会社研究開発センター内
		(74) 代理人	100088904 弁理士 庄司 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 高濃度磁性ビーズ固相迅速測定法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、磁性ビーズを固相として使用して被検物質をその特異結合物質により測定する測定法の迅速化を課題とする。

【解決手段】高濃度の磁性ビーズを使用して磁性ビーズの磁石による集積を迅速化して課題を解決した。さらに、これに加えて短時間で測定できる測定用標識物質を使用することを組合わせて、課題をより完全に解決した。内径約7 mm、外径約8 mmのテストチューブ中の溶液100  $\mu$ Lに分散された磁性ビーズを5秒間磁石により集積した際に60%以上集積しうような濃度の磁性ビーズを工程の一部またはすべてにおいて使用することを特徴とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】内径約7mm、外径約8mmのテストチューブ中の溶液100 $\mu$ Lに分散された磁性ビーズを5秒間磁石により集積した際に60%以上集積しうような濃度の磁性ビーズを工程の一部またはすべてにおいて使用することを特徴とする被検物質の特異結合物質を使用して被検物質を測定する固相測定法。

【請求項2】以下に記載のA、Bの2工程により被検物質を競合的または非競合的に測定することを特徴とする請求項1に記載の固相測定法（競合的または非競合的非転移固相測定法）。

A工程：被検物質（修飾もしくは標識された被検物質を含む）とその特異結合物質（修飾もしくは標識された特異結合物質を含む）との複合体を固相上に形成させる工程

B工程：A工程において固相上に形成させた複合体を測定する工程。

【請求項3】以下に記載のC、D、Eの3工程により被検物質を競合的または非競合的に測定することを特徴とする請求項1に記載の固相測定法（競合的または非競合的転移固相測定法）。

C工程：被検物質（修飾もしくは標識された被検物質を含む）とその特異結合物質（修飾もしくは標識された特異結合物質を含む）との複合体を固相（第一固相）上に形成させる工程。

D工程：C工程において第一固相上に形成させた複合体を溶出して別の固相（第二固相）へ移しかえる工程。

E工程：D工程において第二固相上に移しかえた複合体を測定する工程。

【請求項4】磁性ビーズの大きさが直径0.5～10 $\mu$ mまたはこれと同等であることを特徴とする請求項1～3のいずれか1に記載の固相測定法。

【請求項5】0.5～30mg/mL（0.05～3%w/v）の濃度で磁性ビーズを使用することを特徴とする請求項1～4のいずれか1に記載の固相測定法。

【請求項6】工程の少なくとも一部において、より迅速でより完全な集積のために測定用磁性ビーズとは別のキャリア磁性ビーズを添加することを特徴とする請求項1～5のいずれか1に記載の固相測定法。

【請求項7】B工程またはE工程において、使用した磁性ビーズの一部を使用することにより、または使用した磁性ビーズの少なくとも一部を除去することにより測定用標識物質の測定の高濃度磁性ビーズによる妨害を軽減することを特徴とする請求項1～6のいずれか1に記載の固相測定法。

【請求項8】固相の洗浄を含むA工程を1分以上5分間以下で実施することを特徴とする請求項2、4～7のいずれか1に記載の固相測定法。

【請求項9】固相の洗浄を含むC工程およびD工程を2分間以上10分間以下で実施することを特徴とする請求

項3、4～7のいずれか1に記載の固相測定法。

【請求項10】測定用標識物質としてアルカリホスファターゼを、基質としてdioxetane誘導体をそれぞれ使用し、A工程およびB工程の全工程を3分以上10分間以下で実施する請求項2、4～7のいずれか1に記載の固相測定法。

【請求項11】測定用標識物質としてアルカリホスファターゼを、基質としてdioxetane誘導体をそれぞれ使用し、C工程、D工程およびE工程の全工程を4分以上15分間以下で実施する請求項3、4～7のいずれか1に記載の固相測定法。

【請求項12】測定用標識物質としてアクリジニウム誘導体を使用し、A工程およびB工程の全工程を2分以上6分間以下で実施する請求項2、4～7のいずれか1に記載の固相測定法。

【請求項13】測定用標識物質としてアクリジニウム誘導体を使用し、C工程、D工程およびE工程の全工程を3分以上11分間以下で実施する請求項3、4～7のいずれか1に記載の固相測定法。

【請求項14】請求項1～13のいずれか1に記載の固相測定法に使用しうる少なくとも1の固相あるいは／および試薬を含む測定キット。

【請求項15】請求項1～13のいずれか1に記載の固相測定法に使用しうる固相、試薬および自動ソフトを含む測定システム。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明が属する技術分野】本発明はヒトの臨床検査、獣医検査、食品衛生検査など多くの分野で利用される技術に関する。詳しくは、被検物質をその特異結合物質と固相を用いて迅速に測定する新規な固相測定法、さらに詳しくは、被検物質（修飾もしくは標識された被検物質を含む）とその特異結合物質（修飾もしくは標識された特異結合物質を含む）との複合体を固相上に形成、固定した後、該複合体を測定することにより被検物質を競合的または非競合的に測定する新規な迅速測定法（以下競合的または非競合的非転移固相測定法と記載）、被検物質（修飾もしくは標識された被検物質を含む）とその特異結合物質（修飾もしくは標識された特異結合物質を含む）との複合体を固相（第一固相）上に形成させた後、該複合体を溶出して別の固相（第二固相）に移しかえ、第二固相上の該複合体を測定することにより被検物質を競合的または非競合的に測定する新規な迅速高感度測定法（以下競合的または非競合的転移固相測定法と記載）、該測定法のための少なくとも1の固相あるいは／および試薬を含む測定キットならびにそのための固相、試薬および自動化ソフトを含む測定システムに関する。

## 【0002】

【従来の技術】従来、ヒトの臨床検査をはじめとして、獣医検査、食品検査など多くの分野で、被検物質に対す

る特異結合物質と固相を用いて実施する測定法が広く普及している。例えば、抗原、抗体、DNA、生理作用物質などの被検物質に対して、それぞれ抗体、抗原、被検DNAとハイブリダイズするDNA断片、受容体などの特異結合物質との複合体を固相上に形成させて、固相上の複合体を測定する測定法が広く使われている。特異結合物質と固相を使用する上記の測定法を高感度化する方法も開発されている(E.Ishikawa, Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology vol.27, S.Pilla i, P.C.van der Vliet eds., Elsevier, Amsterdam, pp 79-191, 1999)。つまり、被検物質と特異結合物質との複合体を固相(第一固相)上に形成させた後、複合体を第一固相から溶出して別の固相(第二固相)へ移しかえて、第二固相上の複合体を測定することにより被検物質を測定する方法(以下非競合的転移固相測定法と記載)である。

【0003】非競合的転移固相測定法は、以下のC、D、Eの3つの工程を含む。C工程は、3つの異なる工程、つまり被検物質または被検物質とその特異結合物質(修飾もしくは標識された特異結合物質を含む)の複合体を第一固相に固定する工程(C-1工程)、被検物質にその特異結合物質(修飾もしくは標識された特異結合物質を含む)を結合させ、両者を含む複合体を形成させる工程(C-2工程)およびC-1工程とC-2工程の後の第一固相を洗浄する工程(C-3工程)からなる。D工程も3つの異なる工程、つまり、C工程の後に該複合体を第一固相から溶出する工程(D-1工程)、溶出した該複合体を第二固相上にトラップする工程(D-2工程)およびD-2工程の後の第二固相を洗浄する工程(D-3工程)からなる。E工程は、第二固相に移しかえた該複合体を測定する工程である。この非競合的転移固相測定法は、より大きな表面積の例えば磁性微小粒子固相を使用してC-1工程あるいは／およびD-2工程における被検物質または該複合体の第一固相上あるいは／および第二固相上へのトラップをより完全により迅速に実施する方法(特願2001-140417)、より高濃度の特異結合物質(修飾もしくは標識された特異結合物質を含む)を使用してC-2工程における該複合体の形成をより完全により迅速に実施する方法(特願2001-170186)、より高性能のモノクローナル抗ハプテン抗体を使用してD-1工程における該複合体の第一固相からの溶出をより完全により迅速に実施する方法(特願2000-400853;特願2001-398063)、固相の洗浄回数を最小限としC-3工程とD-3工程をより迅速に実施すると同時に測定を低コスト化する方法(特願2001-204964)などにより迅速高感度化低コスト化された。しかし、磁性ビーズを固相として使用する固相測定法においては、磁性ビーズを洗浄するために長時間を要する。特に、反応液中お

よび洗浄液中に分散させた磁性ビーズを磁石により集積するのに長時間を要する欠点がある。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、磁性ビーズを固相として使用することを特徴とする競合的および非競合的固相測定法の迅速化を課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明においては、競合的および非競合的測定法の工程の一部またはすべてにおいて、高濃度の磁性ビーズを用いて、磁性ビーズの磁石による集積を迅速化することにより課題を解決した。これに、dioxetane誘導体を基質とするアルカリホスファターゼまたはアクリジニウム誘導体を測定用標識物質として使用することにより標識物質の測定に要する時間をも短縮することを組み合わせて、課題をより完全に解決した。つまり、本発明は

1、内径約7mm、外径約8mmのテストチューブ中の溶液100 $\mu$ Lに分散された磁性ビーズを5秒間磁石により集積した際に60%以上集積しうるような濃度の磁性ビーズを工程の一部またはすべてにおいて使用することを特徴とする被検物質の特異結合物質を使用して被検物質を測定する固相測定法。

2、以下に記載のA、Bの2工程により被検物質を競合的または非競合的に測定することを特徴とする前項1に記載の固相測定法(競合的または非競合的非転移固相測定法)。

A工程:被検物質(修飾もしくは標識された被検物質を含む)とその特異結合物質(修飾もしくは標識された特異結合物質を含む)との複合体を固相上に形成させる工程

B工程:A工程において固相上に形成させた複合体を測定する工程。

3、以下に記載のC、D、Eの3工程により被検物質を競合的または非競合的に測定することを特徴とする前項1に記載の固相測定法(競合的または非競合的転移固相測定法)。

C工程:被検物質(修飾もしくは標識された被検物質を含む)とその特異結合物質(修飾もしくは標識された特異結合物質を含む)との複合体を固相(第一固相)上に形成させる工程。

D工程:C工程において第一固相上に形成させた複合体を溶出して別の固相(第二固相)へ移しかえる工程。

E工程:D工程において第二固相上に移しかえた複合体を測定する工程。

4、磁性ビーズの大きさが直径0.5~10 $\mu$ mまたはこれと同等であることを特徴とする前項1~3のいずれか1に記載の固相測定法。

5、0.5~30mg/mL(0.05~3%w/v)の濃度で磁性ビーズを使用することを特徴とする前項1~4のいずれか1に記載の固相測定法。

6. 工程の少なくとも一部において、より迅速でより完全な集積のために測定用磁性ビーズとは別のキャリアー磁性ビーズを添加することを特徴とする前項1～5のいずれか1に記載の固相測定法。

7. B工程またはE工程において、使用した磁性ビーズの一部を使用することにより、または使用した磁性ビーズの少なくとも一部を除去することにより測定用標識物質の測定の高濃度磁性ビーズによる妨害を軽減することを特徴とする前項1～6のいずれか1に記載の固相測定法。

8. 固相の洗浄を含むA工程を1分間以上5分間以下で実施することを特徴とする前項2、4～7のいずれか1に記載の固相測定法。

9. 固相の洗浄を含むC工程およびD工程を2分間以上10分間以下で実施することを特徴とする前項3、4～7のいずれか1に記載の固相測定法。

10. 測定用標識物質としてアルカリホスファターゼを、基質としてdioxetane誘導体をそれぞれ使用し、A工程およびB工程の全工程を3分間以上10分間以下で実施する前項2、4～7のいずれか1に記載の固相測定法。

11. 測定用標識物質としてアルカリホスファターゼを、基質としてdioxetane誘導体をそれぞれ使用し、C工程、D工程およびE工程の全工程を4分間以上15分間以下で実施する前項3、4～7のいずれか1に記載の固相測定法。

12. 測定用標識物質としてアクリジニウム誘導体を使用し、A工程およびB工程の全工程を2分間以上6分間以下で実施する前項2、4～7のいずれか1に記載の固相測定法。

13. 測定用標識物質としてアクリジニウム誘導体を使用し、C工程、D工程およびE工程の全工程を3分間以上11分間以下で実施する前項3、4～7のいずれか1に記載の固相測定法。

14. 前項1～13のいずれか1に記載の固相測定法に使用しうる少なくとも1の固相あるいは／および試薬を含む測定キット。

15. 前項1～13のいずれか1に記載の固相測定法に使用しうる固相、試薬および自動ソフトを含む測定システム。

からなる。

#### 【0006】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。本発明は、特異結合物質と小粒子状または微小粒子状の磁性の固相を使用して被検物質を測定する固相測定法、詳しくは、被検物質（修飾もしくは標識された被検物質を含む）とその特異結合物質（修飾もしくは標識された特異結合物質を含む）との複合体を固相上に形成させるA工程および該複合体を測定するB工程により被検物質を競合的または非競合的に測定する測定法（以下

競合的または非競合的非転移固相測定法と記載）ならびに被検物質（以下修飾もしくは標識された被検物質を含む）とその特異結合物質（以下修飾もしくは標識された特異結合物質を含む）との複合体を固相（第一固相）上に形成させるC工程、該複合体を溶出して別の固相（第二固相）に移しかえるD工程および第二固相上の該複合体を測定するE工程により被検物質を競合的または非競合的に測定する測定法（以下競合的または非競合的転移固相測定法と記載）に適用することができる。

10 【0007】本発明における被検物質は、特異結合物質が存在しうる全ての物質である。その特異結合物質の種類によって分類すると、被検物質は、抗原、抗体、レセプター、リガンド、レクチン、糖鎖化合物、RNA、DNA、ハプテンなどが挙げられる。被検物質の機能から分類すると、ホルモン、イムノグロブリン、凝固因子、酵素、薬剤などと呼ばれるものを含む。物質名では、血清アルブミン、マクログロブリン、フェリチン、 $\alpha$ -フェトプロテイン、CEA、前立腺特異抗原（PSA）、B型肝炎ウイルス表面抗原（HBsAg）、HIV-1 p24などが被検物質の例として挙げられる。これらの被検物質は、血液、唾液、尿、鼻汁、涙液、糞便、組織抽出液、培養液などに含まれる場合も多い。被検物質は、天然物、人工合成物、遺伝子組換え産物などのいずれでもよく、その由来、存在状態などにより限定されるものではないと同時に例示によっても限定されない。

【0008】本発明における特異結合物質は、被検物質と特異的に結合する物質をいう。抗原に対しては、抗体、抗体に対しては抗原、ハプテンに対しては抗ハプテン抗体、抗ハプテン抗体に対してはハプテン、DNAに対してはハイブリダイズすることができるDNA、ビオチンに対してはアビジンあるいはストレプトアビジン、アビジンあるいはストレプトアビジンに対してはビオチンあるいはビオチン化タンパク、ホルモン受容体（例えばインスリン受容体）に対してはホルモン（例えばインスリン）、ホルモン（例えばインスリン）に対してはホルモン受容体（例えばインスリン受容体）、レクチンに対しては対応する糖鎖、糖鎖に対しては対応するレクチンなどがそれぞれ特異結合物質の例として挙げられる。また、特異結合物質は、特異的結合能を有するそれらのフラグメントあるいはサブユニット、修飾もしくは標識された特異結合物質、修飾もしくは標識された特異的結合能を有するそれらのフラグメントあるいはサブユニットなどをも含む。例えば、ビオチン化抗原、ビオチン化抗体、ビオチン化Fab'、酵素標識抗原、酵素標識抗体、酵素標識Fab'、ハプテン化抗原、ハプテン化抗体、ハプテン化Fab'、ビオチン化レセプター、ビオチン化ホルモン、ビオチン化ホルモン受容体、酵素標識ホルモンレセプターなどが例示されるが、これらに限定されるものではない。

40 【0009】本発明の測定法における少なくとも1の固

相は、磁性ビーズであるが、それを除けば、従来の固相測定法で使用されてきたものでも、あるいは新しいものでもよく、材質、形状、大きさのなどによって限定されない。例えば、種々の大きさのポリスチレン球、ナイロン球、ガラス球、ポリスチレン試験管内面、ポリスチレンマイクロプレート、ラテックス粒子、各種磁性粒子などいずれでもよい。本発明において固相上に形成、固定もしくはトラップされる、あるいは固相から溶出される被検物質（修飾もしくは標識された被検物質を含む）とその特異結合物質（修飾もしくは標識された特異結合物質を含む）との複合体は、両者の特異結合により形成される。複合体の形成方法は限定されないで、種々の方法あるいは種々の反応順序で複合体を形成させることができる。つまり、固相、特異結合物質、被検物質を種々の順序で順次反応させてもよく、また、これらの一部あるいはすべてを同時に反応させてもよい。また、複合体に含まれる両者の分子数は、限定されるものではないが、それぞれ1分子以上多くの場合数分子以下である。複合体に含まれる両者の分子数の比も限定されるものではないが、1以上で10以下のことが多い。さらに、複合体と固相との間にどのような結合を1以上介在させてもよい。

【0010】上記のように固相上に形成、固定もしくはトラップされる、あるいは固相から溶出される複合体を構成する特異結合物質は、必ずしも修飾あるいは標識される必要はない。例えば、物理的吸着により固相上に固定した特異結合物質に被検物質と酵素標識特異結合物質を結合して固相上に複合体を形成させることができる。該複合体は界面活性剤により固相から溶出することができる。しかし、特異結合物質は修飾あるいは標識されることが多い。

【0011】このように特異結合物質を修飾あるいは標識する目的は2つである。その1は、両者を含む複合体を固相上に固定もしくはトラップ、あるいは固相から溶出するためであり、他の1つは、両者を含む複合体を測定するためである。

【0012】上記のような両者を含む複合体を固相上に固定もしくはトラップ、あるいは固相から溶出することができる限り、あるいは迅速に高感度で測定ができる限り、修飾あるいは標識の方法、そのために使用する物質の種類、特異結合物質分子に導入する分子数などに制限はない。

【0013】両者を含む複合体を固相上に固定もしくはトラップ、あるいは固相から溶出するために、例えば、ハプテン、抗ハプテン抗体、荷電物質、DNA、チオール基を含む物質、チオピリジル基を含む物質、リガンド、レセプター、レクチン、糖鎖ビオチン、アビジン、ストレプトアビジンなどが、修飾あるいは標識に使用されるが、このように修飾あるいは標識された物質を含む複合体は、それぞれ、抗ハプテン抗体、ハプテン、荷電

物質、DNA、チオピリジル基を含む物質、チオール基を含む物質、レセプター、リガンド、糖鎖、レクチンなどを不溶化した固相上に、ハプテン-抗ハプテン抗体結合、イオン結合、DNAハイブリッド結合、ジスルフィド結合、リガンド-レセプター結合、レクチン-糖鎖結合、ビオチン-アビジン結合、ビオチン-ストレプトアビジン結合などを介して固定あるいはトラップされ、ハプテン、イオン、高温、還元剤、リガンド、糖質、ビオチンなどにより固相から溶出される。これらの2以上の結合を固相と複合体の間に介在させて、複合体を固相に固定あるいはトラップし、2以上の物質あるいは/および方法を組み合わせて複合体を溶出することもできる。ただし、ビオチン-アビジン結合、ビオチン-ストレプトアビジンは複合体の溶出のためには使われることは殆どない。

【0014】上記のような両者を含む複合体の高感度測定法のために、より高感度でより迅速に測定しうる物質が測定用修飾物質あるいは測定用標識物質として使われる。例えば、酵素、ラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、金属など、具体的には、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、 $I^{131}$ 、 $I^{125}$ 、フルオレセイン、エクオリン、アクリジニウム、ユーロピウム、金コロイドが測定用修飾物質あるいは測定用標識物質として使われる。上記のように、種々に修飾あるいは標識され、両者の複合体が種々に形成、固定されるので、両者を含む複合体の構成は様々であるが、具体例として、次のような例を挙げることができる。特異結合物質-酵素標識被検物質、2,4-ジニトロフェニル化ビオチン化特異結合物質-酵素標識被検物質、特異結合物質-被検物質-酵素標識特異結合物質、2,4-ジニトロフェニル化ビオチン化特異結合物質-被検物質-酵素標識特異結合物質、2,4-ジニトロフェニル化特異結合物質-被検物質-酵素標識特異結合物質などである。2,4-ジニトロフェニル基、ビオチンは、上記の荷電物質、DNA、チオール基などで、また酵素は、上記のラジオアイソトープ、蛍光物質、発光物質、金属などで、それぞれ置きかえることができる。

【0015】A工程とC工程における複合体の形成の違いは、A工程の複合体は固相から溶出できることは必ずしも必要ないのに対し、C工程の複合体は固相から多くの場合分離することなく固相から溶出できることである。本発明における溶出液とは、上記のような両者を含む複合体を固相から溶出するための溶液である。溶液の組成は、該複合体が固相上に固定されている状態により異なる。例えば、該複合体が固相上に固定されている結合が物理的吸着の場合には、界面活性剤を含む溶液、ハプテン-抗ハプテン抗体の結合の場合には、ハプテンあるいはハプテン誘導体を含む溶液、イオン結合の場合には、イオンを含む溶液、ジスルフィド結合の場合には、還元剤を含む溶液、DNAハイブリッドの場合には、温

度の高い液などであるが、これらに限定されない。

【0016】本発明における上記のような両者を含む複合体の溶出方法は、種々の方法で実施される。通常は、溶出液と該複合体を固定している固相とを振とうあるいは攪拌などにより接触あるいは混合させ、一定時間後に両者を分離する。両者を分離する方法も公知の種々の方法がある。単なる溶出液の吸引除去をはじめとして、遠心力、磁気力、フィルターなどによる粒子固相の分離などである。従来の公知方法に限定されない。

【0017】第一固相から溶出した両者を含む複合体は、第一固相上に固定化するために使用した結合とは異なる種々の結合、例えばハプテン-抗ハプテン抗体結合、DNAハイブリッド結合、イオン結合、ビオチン-アビジンあるいはストレプトアビジン結合などにより第二固相上にトラップすることができる。そのためには、特異結合物質をあらかじめ、第一固相上に固定するために使用した修飾物質とは異なる修飾物質、例えば、ハプテン、DNA、荷電物質、ビオチン、抗ハプテン抗体、アビジン、ストレプトアビジンなどにより修飾しておく必要がある。第二固相には、抗ハプテン抗体、修飾に使用したDNAとハイブリダイズしうるDNA、荷電物質、アビジン、ストレプトアビジン、ビオチンなどを不溶化しておく必要がある。また、被検物質と結合しうる特異結合物質を第二固相に不溶化しておいて、両者を含む複合体を第二固相上にトラップすることもできる。例えば、被検物質が抗体の場合には、抗イムノグロブリン抗体不溶化第二固相、抗原の場合には抗体不溶化第二固相、DNAの場合は、ハイブリダイズしうるDNA不溶化第二固相などである。

【0018】非転移測定法のA工程において固相上に形成させた両者を含む複合体または転移測定法のD工程において第二固相に移しかえた両者を含む複合体は種々の方法で測定することができる。B工程またはE工程において測定用標識物質で標識した特異結合物質を結合させることもあるが、多くの場合、A工程、C工程、あるいはD工程において、測定用標識被検物質または測定用標識特異結合物質が結合させてある。この測定用標識物質を、該複合体が固相上に固定された状態で、あるいは、再び該複合体の一部あるいはすべてを溶出して測定すればよい。

【0019】本発明において第一固相から溶出される複合体は、多くの場合解離しないが、複合体の測定に支障がない限り、複合体の一部が解離してもよい。例えば、ハプテン化抗原-抗体-標識抗原、ハプテン化抗体-抗原-標識抗体のような複合体が、解離して抗体-標識抗原、抗原-標識抗体となっても、抗イムノグロブリン抗体不溶化第二固相、抗体不溶化第二固相にトラップして複合体を測定することができる。

【0020】上記の競合的または非競合的非転移または転移固相測定法においては、種々の段階で固相の反応液

または洗浄液との接触、混合およびこれらからの分離が必要である。つまり、固相として使用した磁性ビーズの分散液からの集積が必要である。例えば、検体中の被検物質とその特異結合物質（修飾もしくは標識された特異結合物質を含む）との複合体を固相上に形成させた後、次の特異結合物質（修飾もしくは標識された特異結合物質を含む）と反応させる前、または固相上に形成、固定またはトラップされた該複合体を測定または溶出する前に固相を反応液から分離して洗浄することが多い。磁性ビーズを固相として使用した場合は、磁性ビーズを反応液から集積し、再び洗浄液中に分散させ、集積する操作をくり返すことが多い。また、例えば酵素標識を結合させた固相、磁性ビーズを基質液と混合、反応させ、磁性ビーズを集積して除去した後、基質液の蛍光強度、発光強度を測定することもある。磁性ビーズの集積には磁気分離が好んで使用される。このような磁性ビーズの反応液、洗浄液、基質液などからの分離集積を、本発明においては、高濃度の磁性ビーズを使用することにより、より迅速にしかもより完全に実施することができるので、迅速高感度測定法を提供することができるが、公知の方法と大きく異なる。

【0021】本発明における固相の洗浄液は、従来の固相測定法で使用されてきたものでも、新しいものでもよく、組成、pH、温度などによって限定されない。例えば、各種蛋白質、各種界面活性剤、各種動物血清、各種糖質、各種脂質などを含む、あるいは含まない各種緩衝液、あるいは水などのいずれでもよい。

【0022】本発明における固相の洗浄法は、従来の固相測定法で実施されてきた方法でも、新しい方法でもよく、操作、方法、温度、時間などによって限定されない。例えば固相の全表面と洗浄液を攪拌、振とうなどにより接触あるいは混合し、洗浄液を吸引あるいは固相がラテックス、磁性ビーズなどの場合には、遠心、磁気などにより固相から分離、吸引して除去する。

【0023】本発明においては、より高濃度の磁性ビーズを使用して、より短時間内により高い集積率を達成する。つまり、磁性ビーズを磁石により5秒間集積した際に60%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、最も好ましくは90%以上集積しうるような濃度を使用する。磁性ビーズの集積率を計測する際には、磁性ビーズを内径約7mm、外径約8mmのテストチューブ中の液100 $\mu$ Lに分散させた後、集積を実施する。この際の分散液、温度、磁石、テストチューブの材質、テストチューブと磁石との距離などの条件は、被検物質の測定に使用するそれらと同じか、または同等のものとする。測定法の全工程において高濃度の磁性ビーズを使用してもよいが、一部の工程、例えば、分散された磁性ビーズを集積する操作をはじめの前にキャリア磁性ビーズを添加した後、集積してもよい。非特異ジグナルの低いキャリア磁性ビーズを添加すれば測定の非



特異シグナルを低くすることができるので、高感度測定も可能となる。

【0024】使用する磁性ビーズの材質、形状、大きさ、濃度に制限はないが、直径0.5～10 $\mu$ m、好ましくは1～5 $\mu$ mまたはこれと同等、濃度は0.5～30mg/mL(0.05～3%w/v)好ましくは2～10mg/mLである。このように、より迅速に、より完全に集積しうる濃度の磁性ビーズを使用することにより、競合的または非競合的非転移固相測定法において洗浄工程を含むA工程を1～5分間で、また競合的または非競合的転移固相測定法において、洗浄工程を含むCおよびDの2工程を2～10分間で、それぞれ実施して、被検物質の迅速測定法を提供することができる。さらには、これに加えて、B工程またはE工程を迅速化して格段に迅速な被検物質の測定法を提供することができる。つまり、B工程またはE工程は、迅速に測定しうる測定用標識物質を使用することにより迅速化することができる。測定用標識物質としてdioxetane誘導体を基質として発光法により測定するアルカリホスファターゼが好ましい。この酵素は市販のdioxetane誘導体基質CDP-star(Tropix社)などを用いて1～5分間で充分高感度で測定することができるからである。このことは広く知られている。したがって、競合的または非競合的非転移固相測定法におけるA工程およびB工程の全工程を3～10分間で、競合的または非競合的転移固相測定法におけるC工程、D工程およびE工程の全工程を4～15分間でそれぞれ実施して、充分高感度が得られる。さらには、アルカリホスファターゼの代りにアクリジニウム誘導体を測定用標識物質とすることにより、一層の迅速化が可能である。つまり、アクリジニウム誘導体は、試薬の混合などに要する時間を除けば、ほぼ瞬間的に高感度で発光測定ができるので、競合的または非競合的非転移固相測定法におけるA工程およびB工程の全工程を2～6分間で、競合的または非競合的転移固相測定法におけるC工程、D工程およびE工程の全工程を3～11分間で、それぞれ実施して充分な高感度が得られる。

【0025】高濃度の磁性ビーズに結合した測定用標識物質のシグナル、例えば吸光度、発光強度、蛍光強度等の測定は、磁性ビーズにより著しく妨害されることが多い。高濃度の磁性ビーズを使用しているため、磁性ビーズを迅速に磁気分離により除去して吸光度、発光強度、蛍光強度等を測定することができる。また、希釈により磁性ビーズの妨害を軽減して測定を実施することもできる。この場合には、非特異シグナルの低い溶液により希釈することで測定を高感度化できる利点もある。

【0026】例えば、磁性ビーズに結合したアルカリホスファターゼ、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼなどの測定用標識物質を蛍光基質液または発光基質液とインキュベートした後、蛍光強度または発光強度を測定すると高濃度の磁性ビーズによる消光により高感度測定ができない。

しかし、本発明においては、高濃度の磁性ビーズを使用するので、基質液とインキュベートした後、磁性ビーズを迅速に磁気分離除去してシグナルを測定することができる。または、高濃度の磁性ビーズと基質液とをインキュベートした後、基質を含まない非特異シグナルの低い溶液により希釈してシグナルを測定することにより、磁性ビーズによる消光を軽減すると同時に基質による非特異シグナルも低下させることができるので高感度測定が可能である。さらには、使用した磁性ビーズの一部のみを基質液とインキュベートして消光を軽減した状態で測定を実施することもできる。

【0027】以下競合的および非競合的非転移固相測定法ならびに競合的および非競合的転移固相測定法の全工程をさらに具体的に説明する。ただし、以下の具体例に限定されない。

【0028】競合的非転移固相測定法によりハプテンまたは抗原を測定する典型例は、抗被検物質抗体不溶化固相と被検物質—測定用標識物質を使用する公知の方法とその変法である。例えば、限定された量の抗T3抗体を不溶化した固相、被検T3および酵素標識T3を反応させて、該固相を洗浄した後、該固相に結合した酵素活性を測定することにより被検T3を測定する方法は、公知の競合的固相測定法の典型例である。限定された量の抗T3抗体と被検T3および酵素標識T3を反応させた後、過剰の抗T3抗体を不溶化した固相と反応させ、洗浄した後の該固相に結合した酵素活性から被検T3を測定する方法は、変法の1つである。T3を他のハプテンあるいは抗原に変えて、他のハプテンあるいは抗原を測定することができる。T3と抗T3抗体をそれぞれ抗体と抗原に置きかえて抗体を測定する方法も公知の方法である。限定された量の抗体を不溶化あるいは／および酵素標識し、かつ限定された量の抗原を使用する抗原の測定方法も、抗原と抗体を入れかえた抗体の測定法も公知の競合固相測定法である。測定用標識物質は酵素に限定されない。

【0029】非競合的非転移固相測定法により抗原または抗体を測定する典型例は、公知のサンドイッチ測定法とその変法である。抗体不溶化固相、抗原、酵素標識抗体を種々の順序で反応させた後、洗浄した固相に結合した酵素活性から抗原を測定する測定法、抗原不溶化固相、抗体、酵素標識抗原を種々の順序で反応させた後、洗浄した固相に結合した酵素活性から抗体を測定する測定法は、ともに公知のサンドイッチ法の典型例である。酵素標識抗原の代わりに酵素標識抗イムノグロブリン抗体を使用することもできる。DNAも同様の原理で測定することができる。測定用標識物質は酵素に限定されない。

【0030】非競合的転移固相測定法により抗原を測定する典型例においては、被検物質としての抗原とその特異結合物質の抗体との複合体を例えばハプテン—抗ハプ



テン抗体の結合を介して第一固相上に形成させる。まず固相（第一固相）上に抗ハプテン抗体を不溶化して、ハプテン化抗体を結合させる。ついで、抗原を第一固相上にトラップすることができる。さらに、酵素標識抗体を反応させて、ハプテン化抗体(2)－抗原(3)－酵素標識抗体(4)の3者からなる複合体を抗ハプテン抗体不溶化第一固相(1)の上に形成させる。

【0031】抗ハプテン抗体不溶化第一固相(1)、ハプテン化抗体(2)、抗原(3)、酵素標識抗体(4)の反応順序は種々変えることができる。(1)と(2)をあらかじめ反応させたものと、(3)と(4)をあらかじめ反応させたものとを反応させて、複合体を形成させることができる。また、(2)と(3)をあらかじめ反応させた後、(1)と反応させ、ついで(4)と反応させ、(1)の上に(2)+(3)+(4)の複合体を形成させることができる。

【0032】さらには、(2)(3)(4)の順、(3)(4)(2)の順あるいは3者を同時に反応させて、3者の複合体を形成させ、(1)に結合させることができる。

【0033】非競合的転移固相測定法により抗体を測定する典型例においては、被検物質としての抗体とその抗原との複合体を例えばハプテンと抗ハプテン抗体の結合を介して第一固相上に形成させる。抗ハプテン抗体不溶化第一固相(5)、ハプテン化抗原(6)、抗体(7)、酵素標識抗原(8)を順次反応させる。上記の抗原の測定のために(1)、(2)、(3)、(4)を順次反応させた場合の抗原と抗体を置きかえた以外は全く同様である。(8)の代わりに酵素標識抗イムノグロブリン抗体(9)を使っても全く同様である。(6)、(7)、(8)を同時に反応させて3者の複合体を(5)の上に形成させる場合は、上記(2)、(3)、(4)を同時に反応させて(1)の上に3者の複合体を形成させる場合と抗原と抗体を入れかえる以外は全く同様である。

【0034】非競合的転移固相測定法によりDNAを測定する典型例においては、被検物質としてのDNAとトラップ用DNAおよび測定用DNAとの複合体をハプテン－抗ハプテン抗体の結合を介して第一固相上に形成させる。ハプテン化トラップ用DNA－被検物質DNA－ビオチン化（または酵素標識）測定用DNAの複合体を被検物質が抗原の場合と同様にして第一固相上に形成させることができる。被検物質がDNAの場合は、ハプテン化トラップ用抗体と酵素標識測定用抗体が抗原分子上の異なる2つの部位に結合する抗原の場合と同様である。しかし、被検物質が抗体の場合とは異なる。つまり、ハプテン化トラップ用抗原と酵素標識測定用抗原が抗体分子上の異なる2つの部位に結合するけれども、2つの部位に結合する抗原のエピトープは同一である。もちろん、被検物質DNAが同じ塩基配列の部位を2つ以上もっている場合は、被検物質が抗体である場合と同様となる。被検物質RNAはDNAに転換して上記のように測定することができる。

【0035】ハプテン－抗ハプテン抗体の結合を介する代わりに、ジスルフィド結合(-S-S-)、イオン結合、DNAハイブリッドまたは物理的吸着を介して被検物質（修飾または標識された被検物質を含む）とその特異結合物質（修飾または標識された特異結合物質を含む）との複合体を固相（第一固相）上に形成させることができる。ただし、ジスルフィド結合、物理的吸着を介する場合には、被検物質を第一固相上にトラップするための特異結合物質をこれらの結合を介して固定化しておくことが好ましい。

【0036】例えば、被検物質が抗原の場合には、第一固相－ウシ血清アルブミン-S-S-抗体、第一固相－物理的吸着抗体、被検物質が抗体の場合には、第一固相－ウシ血清アルブミン-S-S-抗原、第一固相－物理的吸着抗原、被検物質がDNAの場合には第一固相－ウシ血清アルブミン-S-S-DNAなどのように、あらかじめ第一固相を調製することが好ましい。

【0037】本発明で使う測定法のD工程はC工程で第一固相上に複合体を形成させ固定化させた方法に対応した方法で実施する（前出E. Ishikawa, *Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 27*, S. Pillai, P.C. van der Vliet eds., pp. 71-191, 1999）。C工程でハプテン－抗ハプテン抗体結合を介して複合体を第一固相上に形成させた場合は、高濃度のハプテンにより複合体を溶出する。ジスルフィド結合を介して複合体が第一固相上に形成されている場合には、2-メルカプトエチルアミンなどの還元剤により還元して複合体を溶出する。イオン結合を介して複合体が形成されている場合には、高濃度の塩類により溶出する。DNAハイブリッドを介して複合体が第一固相上に形成されている場合には、温度を上昇させて溶出する。物理的吸着を介して複合体が第一固相上に形成されている場合には、界面活性剤により溶出する。複合体が2以上の結合を介して第一固相上に形成されている場合には、2以上の方法により溶出できる。例えば、抗ハプテン抗体が物理的吸着により第一固相上に不溶化され、その上に抗ハプテン抗体－ハプテン結合を介して複合体が形成されている場合には高濃度のハプテンと界面活性剤の両方で溶出することができる（S. Ishikawaら, *Anal. Lett.* Vol. 33, No. 11, pp. 2183-2196, 2000）。

【0038】複合体がハプテン化抗原－抗体－酵素標識抗原の場合には、抗イムノグロブリン抗体不溶化第二固相に固定化（トラップ）することができる。

【0039】複合体が、ハプテン化ビオチン化抗体－抗原－酵素標識抗体、ハプテン化ビオチン化抗原－抗体－酵素標識抗原、H S-ビオチン化抗体－抗原－酵素標識抗体、ハプテン化ビオチン化抗原－抗体－酵素標識抗イムノグロブリン抗体などのように、あらかじめビオチン化されている場合には、第二固相にアビジンまたはスト

レプトアビジンを不溶化して、複合体を第二固相上にトラップすることができる。以上は、溶出液中の複合体を第二固相にトラップする場合であるが、溶出と同時に第二固相にトラップすることができる。例えば、ハプテン-抗ハプテン抗体の結合によって複合体が第一固相上に形成されている場合には、高濃度のハプテンを含む溶出液の中に第一固相と第二固相を同時に加えてインキュベートすれば複合体が溶出されると同時にトラップされる。

【0040】本発明で使う非競合的転移測定法のE工程は、D工程で第二固相上にトラップされた複合体の状態に対応して公知の方法（前出 E. Ishikawa, *Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 27*, S. Pillai, P.C. van der Vlieteds., Elsevier, Amsterdam, pp. 79-120, 1999）により実施することができるが公知の方法に限定されるものではない。第二固相上の複合体に測定用の標識、例えば酵素が導入されていない場合、例えば、第二固相-抗ハプテン抗体-ハプテン化抗原-抗体のような場合には、酵素標識抗イムノグロブリン抗体を結合させてから測定を行うが、多くの場合、C工程ですでに測定用の標識が導入されている。これらの標識を、多くの場合第二固相に固定された状態でそれぞれの測定法により測定すれば、被検物質の測定ができる。しかし、これらの標識の高感度測定法に支障がない限り、標識のみを、あるいは標識と複合体の一部もしくはすべてを第二固相から切り離して測定しても被検物質の測定が可能である。酵素は、その活性を比色法、蛍光法、発光法、ESR強度測定法などにより測定する

【0041】競合的転移固相測定法は、競合的非転移固相測定法において固相上に形成、固定またはトラップした複合体を、上記の非競合的転移固相測定法で用いた方法により溶出可能な状態にして実施することができる。つまり、被検物質（修飾または標識された被検物質を含む）とその特異結合物質（修飾または標識された特異結合物質を含む）の複合体をハプテン-抗ハプテン抗体結合、イオン結合、DNAハイブリッド結合、-S-S-結合などの少なくとも1の結合を介して固相（第一固相）上に作成させ、第一固相から溶出した該複合体を別の固相（第二固相）に移しかえて、第二固相上の該複合体を測定することにより被検物質を測定することができる。上記のような競合的または非競合的非転移または転移固相測定法においては、固相を反応液または／および洗浄液から分離する工程が含まれている。いずれの測定法においても、検体と接触させた固相は、検体を含む反応液からいったん分離して次の反応に移ることもあり、さらに洗浄する場合も多い。洗浄では洗浄液からの固相の分離と洗浄液中への分散とをくり返す。測定用標識と結合した被検物質または特異結合物質と接触した固相は、該標識の測定を行なう前に反応液と分離、その後洗

浄をくり返すのが通常である。また、標識を測定する際に磁性ビーズによる妨害がある場合には、磁性ビーズを集積して除去する場合もある。このような固相を反応液、洗浄液、標識測定用溶液（例えば酵素基質液）などから分離する工程を、本発明においては、より高濃度の磁性ビーズを使用することにより、より迅速に、しかもより完全に実施し、迅速高感度測定を提供する。高濃度の磁性ビーズは、すべての工程において使用しても、磁性ビーズの集積を実施する段階でキャリア磁性ビーズを添加して、高濃度にしてもよい。非特異シグナルの低いキャリア磁性ビーズを使用することにより被検物質を測定する際の特異シグナルを低下させることができる利点もある。

【0042】本発明は、上記に説明した測定方法の実施のための固相、試薬等におよび、また、該固相および緩衝液、ブロッキング液、洗浄液、基質液、抗体、ハプテン等に例示される本発明に使用する少なくとも1の固相あるいは／および試薬を含む測定キットにもおよぶ。さらに、本発明は、上記に説明した測定方法の実施のための固相、試薬および自動化ソフトを含む測定システムにもおよぶ。以上は例示により説明したが、本発明はこれらの例示により限定されるものではない。

【実施例】以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は以下の実施例により限定されるものではない。

#### 【0043】

【実施例1】この実施例では、磁性ビーズの濃度を高くすることにより磁性ビーズの磁石による集積が速くなる効果を示す。

#### （材料と方法）

##### ・磁性ビーズ

MG205（直径0.88 $\mu$ m、比重1.3）、MG210（直径1.7 $\mu$ m、比重1.3）、JSR Corporation, Tokyo, Japan

##### ・磁性粒子ブロッキング液

リン酸緩衝液（pH6.65、0.14M NaCl、2.7mM KCl、1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1g/L NaN<sub>3</sub>、50g/L スキムミルクを含む）

##### ・磁性粒子懸濁液

リン酸緩衝液（pH6.25、0.14M NaCl、2.7mM KCl、1.5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1g/L NaN<sub>3</sub>、1g/L BSA、0.1% Tween20を含む）

##### ・抗体不溶化磁性ビーズ

モノクローナル抗2,4-ジニトロフェニル基抗体-1753（International Reagents Corporation, Kobe, Japan）をJSR Corporationの指示書に従い不溶化し、磁性粒子懸濁液中に4℃で保存した。

## ・磁性ビーズ希釈液

20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.4, 0.15 M NaCl, 0.1% Tween 20, 1 g/L NaN<sub>3</sub> を含む)

## ・磁石

ネオジウム磁石、15×10×5 mm、330 mT、株式会社二六製作所、型番 NK003

## ・テストチューブ

SU-40、内径7 mm、外径8.2 mm、高さ29.8 mm、Sysmex Corporation、Kobe, Japan

## ・吸光度計

U-3210、日立製作所。

## 【0044】・磁性ビーズの集積速度の測定

抗体不溶化磁性ビーズを1、2.5、および5 mg/mLの濃度に希釈し、100 μLをテストチューブに分注した。5および10秒間磁石により該磁性ビーズを集積し、上清を除去した後、磁性ビーズ希釈液100 μLに懸濁、さらに、これを該希釈液により100倍に希釈して、600 nmの吸光度を測定した。

【0045】(結果) 実施例1の結果を表1に示す。磁性ビーズの濃度を1、2.5、5 mg/mLと高くすることにより、5秒間で集積できる割合が、MG205では63.5、71.2、77.7%と、またMG210では88.6、94.4、97.7%とそれぞれ上昇した。つまり、集積率に対する磁性ビーズの濃度の効果が明らかとなった。

## 【0046】

## 【表1】

表1 磁性ビーズの濃度と集積速度 (実施例1)

種類	磁性ビーズ 直径 (μm)	濃度 (mg/mL)	集積率(%)	
			集積時間(秒)	
MG205	0.88	1	5	63.5
		2.5	5	71.2
		5	5	77.7
MG210	1.7	1	5	88.6
		2.5	5	94.4
		5	5	97.7

## 【0047】

【実施例2】この実施例では、5 mg/mL (0.5% w/v) という高濃度の磁性ビーズを使い、アルカリホスファターゼを測定用標識物質とし、dioxetane誘導体を基質とするHBsAg (ヒトB型肝炎ウィルス表面抗原) の非競合的転移固相測定法を10.5分間という短時間で実施して高感度が得られることを示す。

## (材料と方法)

以下に記す材料と方法の他は、実施例1のそれらと同じである。

## ・磁性ビーズ

MG210、直径1.7 μm、比重1.3、JSR Corporation、Tokyo, Japan

・DNP (2,4-ジニトロフェニル基) -ビオチン-抗HBsAg Fab' とALP-抗HBsAg Fab'

DNP化ビオチン化ウシ血清アルブミン-抗HBsAg Fab'-649 (DNP-ビオチン-抗HBsAg Fab') とALP-抗HBsAg Fab'-85 (ALP-抗HBsAg Fab') をマレイミド基とチオール基の反応を使う公知の方法 (E. Ishikawa, Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 27, S. Pillai, P. C. van der Vliet eds., pp. 177-302, 1999) により調製した。

## ・ブロッキング液

0.15 M NaCl, 2.5 mM EDTA, 2.5 g/L ウシ血清アルブミン, 10 g/L シュークロース, 1 g/L NaN<sub>3</sub> を含む10 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.0

## ・抗DNP IgG不溶化磁性ビーズ

磁性ビーズにモノクローナル抗DNP IgG-1753をJSR Corporationの指示書にしたがって不溶化し、ブロッキング液で洗浄した後、4℃で同液中に保存した。

・DNP-ビオチン-抗HBsAg Fab'、ALP-抗HBsAg Fab'、HBsAg、抗DNP IgG不溶化磁性ビーズおよびストレプトアビジン不溶化磁性ビーズの希釈液

## TEA 緩衝液

## ・TEA 緩衝液

1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 0.1% ウシ血清アルブミン, 0.05% NaN<sub>3</sub> を含む0.1 M トリエタノラミン・HCl 緩衝液, pH 7.6

## ・ALP (アルカリホスファターゼ) 用洗浄液

0.15 M NaCl, 0.1% Tween 20, 0.1% NaN<sub>3</sub> を含む20 mM トリス・HCl 緩衝液, pH 7.4

## ・インキュベーション温度

非競合的転移固相測定法の全工程におけるインキュベーション温度は37℃とした。

## 【0048】・免疫複合体の形成

種々の濃度のHBsAg、20 μLと50 pmol/mLのDNP-ビオチン-抗HBsAg Fab'、50 μLと1分間インキュベートした後、1.67%の抗DNP IgGの不溶化磁性ビーズ、30 μLと1分間インキュベートして、該磁性ビーズを磁石により10秒間集積した。ついで上清を除去した後、ALP用洗浄液200 μL中に該磁性ビーズを分散させ、10秒間磁石により集積して上清を除去した。該磁性ビーズを4.8 pmol/mLのALP-抗HBsAg Fab'、100 μL中に分散させ、1分間インキュベートして、該磁性ビーズを10秒間磁石により集積した。ついで上清を除去した後、ALP用洗浄液200 μL中に該磁性ビーズを分散させ、10秒間磁石により集積して上清を除去した。

## 【0049】・リン緩衝液

0.05% Na<sub>3</sub>Nを含む、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.5

## ・ストレプトアビジン

TypeII, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan

## ・DNP-Lys液

3mMεN-2,4-ジニトロフェニル-L-リジンを含むTEA緩衝液

## ・ストレプトアビジン不溶化磁性ビーズ

ビオチン化ウシ血清アルブミンを、公知の方法(E. Ishikawa, Ultrasensitive and Rapid Enzyme Immunoassay, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Vol. 27, S. Pillai, P.C. van derVliet eds., pp. 177-302, 1999)により調製し、これをJSR Corporationの指示書にしたがって磁性ビーズに不溶化した後、30μg/mLのストレプトアビジンをリン酸緩衝液に溶解して反応させ、リン酸緩衝液で洗浄、ブロッキング液中に4℃で保存した。

## 【0050】・免疫複合体の抗DNP IgG不溶化磁性ビーズからの溶出

上記の免疫複合体を結合させた抗DNP IgG不溶化磁性ビーズとDNP-Lys液100μLを0.5分間インキュベートした後、該磁性ビーズを磁石により15秒間集積した上清を溶出液とした。

## 【0051】・免疫複合体のストレプトアビジン不溶化磁性ビーズへの結合

上記溶出液とストレプトアビジン不溶化磁性ビーズ0.5mgを1分間インキュベートした後、該磁性ビーズを磁石により10秒間集積し、上清を除去した後、ALP用洗浄液200μL中に該磁性ビーズを分散させ、再び10秒間磁石により集積して直ちに上清を除去した。

## 【0052】・ALP発光基質液

CDP-star ready to use with Sapphire II, Trolox, Inc., Bedford, MA

## ・発光測定装置

Lumicoounter 2500, Microtec Co., Ltd., Chiba, Japan

## 【0053】・ALP活性の発光測定法

上記複合体結合ストレプトアビジン不溶化磁性ビーズに100μLのALP発光基質液を加え、3分間インキュベートした後、該磁性ビーズを磁石により10秒間集積した上清全量の発光強度を測定し、0.1秒間の発光量を取得した。

## 【0054】

【比較例1】この比較例では公知の方法、ルミパルスII HBsAg, Fujirebio Inc., Tokyo, JapanによりHBsAgを測定して、この感度と実施例2において本発明の方法によりHBsAgを測定したと

きの感度とを比較する。この公知の方法では、dioxetane誘導体を基質とするアルカリホスファターゼを測定用標識物質として使用するが、37.5μg/350μLという低濃度の磁性ビーズを固相とするサンドイッチ法により25~30分間でHBsAgを自動測定装置により測定した。使用した試薬は該自動測定装置のためにフジレバイオ社から供給されたものである。

## 【0055】

【比較例2】この比較例では最も高感度とされる公知の方法（アーキテクト、アボット社）によりHBsAgを測定して、この感度と実施例2において本発明の方法によりHBsAgを測定したときの感度とを比較する。この公知の方法では、アクリジニウム誘導体を測定用標識物質として使用するサンドイッチ法により、28分間でHBsAgを自動測定装置により測定した。使用した試薬は該自動装置のためにアボット社から供給されたものである。

【0056】（結果）実施例2と比較例1、2の結果を表2に示す。5mg/mL（0.5%w/v）という高濃度の磁性ビーズを使用し、アルカリホスファターゼとdioxetane誘導体を、それぞれ測定用標識物質と基質とし、かつ10.5分間という短時間で実施した本発明の非競合的転移固相測定法によるHBsAg測定の感度は、0.00025IU/testであり、これは、アルカリホスファターゼとdioxetane誘導体をそれぞれ測定用標識物質と基質とし、0.107mg/mL、本発明の方法における濃度の47分の1という低濃度の磁性ビーズを使って25~30分間という長時間をかけて実施しなければならなかった公知の方法、ルミパルスII HBsAg, Fujirebio Inc. によるHBsAg測定の感度0.012IU/testより48倍高かった。20μLの検体を使用する本発明の非競合的転移固相測定法による検体中HBsAg測定の感度は0.0125IU/mLであり、これは100μLの検体を使用するルミパルスII HBsAgによる検体中HBsAg測定の感度0.12IU/mLより9.6倍高かった。また、本発明の非競合的転移固相測定法によるHBsAg測定の感度は、アクリジニウム誘導体を測定用標識物質とし、本発明の方法より低濃度の磁性ビーズを使用して28分間という長時間をかけて実施しなければならなかった、しかも最も感度が高いとされる公知の方法、アーキテクト、アボット社によるHBsAg測定の感度0.00375IU/testより15倍高く、20μLの検体を使用する本発明の非競合的転移固相測定法による検体中HBsAg測定の感度は、75μLの検体を使う公知の方法アーキテクトの検体中HBsAg測定の感度0.05IU/mLより4倍高かった。

【0057】〔本発明による高濃度磁性ビーズを使用した非競合的転移固相測定法（実施例2）と低濃度磁性ビーズを使用した公知の方法（比較例1、2）によるHBsAg測定の感度の比較〕

## 【表2】

実施例 または 比較例	磁性ビーズ 濃度 (mg/mL)	測定時間 (分)	検体量 (μL)	HBsAg測定感度と比			
				IU/test	比	IU/mL	比
実施例 2	5	10.5	20	0.00025	1	0.0125	1
比較例 1	0.107	25~30	100	0.0121	48	0.12	9.6
比較例 2		28	75	0.00375	15	0.05	4

【0058】（実施例1、2と比較例1、2により示された発明の効果）高濃度磁性ビーズ、アルカリホスファターゼ、dioxetane誘導体を使用して10.5分間で実施した非競合的転移固相測定法によって公知の方法より高感度が得られたので、測定時間を10.5分間よりさらに短時間としても公知の方法と同等の感度が得られることが明らかとなった。また、実施例2においては、di\*

\* oxetane誘導体を基質とするアルカリホスファターゼの活性の測定には3分間余りを使用したもので、これよりさらに短時間、ほぼ瞬時的に測定することができるアクリジニウム誘導体を測定用標識物質として使用することにより測定時間をさらに一層短縮することが可能なが示された。

フロントページの続き

(72)発明者 松井 淳  
兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際  
試薬株式会社研究開発センター内

Fターム(参考) 2G045 BB20 CA25 CB01 CB03 CB04  
CB07 CB11 DA12 DA13 DA14  
DA20 DA30 DA36 DA54 FA36  
FB02 FB03 FB07 FB15 JA01